

플랑독 난황전구단백질 유전자발현 추적기법

계 명 찬

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Analysis of Vitellogenin Gene Expression in *Synechogobius hastus* (Gobiidae)

Myung Chan Gye

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract - In an effort to develop the tools for monitoring the contamination of xenoestrogen in the aquatic environment of Korea, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of vitellogenin (VTG) mRNA expression were optimized in *Synechogobius hastus*. Based on the partial VTG cDNA sequence VTG mRNA level in livers from male fishes was analyzed by RT-PCR. As an internal control beta actin mRNA was amplified. 3 µg of total RNA was reverse transcribed in 20 µl reaction using murine leukemia virus [MuLV] reverse transcriptase. Subsequent PCR using the 1 µg of cDNA resulted in linear increase in PCR product of VTG in female liver cDNA from 10 to 30 cycles of amplification. On the contrary, in male, PCR product first detected at 28 cycles of amplification and linearly increased during 38 cycles of amplification, suggesting that male *S. hastus* expresses minute amount of VTG mRNA which is 2⁻¹⁸ equivalent of female. In conclusion, the optimized protocol of VTG mRNA expression in the liver of male *S. hastus* will be promising the environmental monitoring the xenoestrogen contamination in the western coast and estuaries in Korea.

Key words : vitellogenin, RT-PCR, estrogen, *Synechogobius hastus*

서 론

최근 중국과 한국 연안 인접지역에서 산업활동의 증가로 인해 중금속, 내분비계장애물질 (endocrine disrupting chemicals, EDCs) 등 다양한 무기, 유기물에 의한 오염이 가속화 되고 있다 (Shim *et al.* 1998; Kang *et al.* 1999; Kaminuma *et al.* 2000; Jeong *et al.* 2001; Khim *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Hong *et al.* 2002; Im *et al.* 2002;

Martin *et al.* 2003; Monirith *et al.* 2003). 따라서 해양환경에서 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가의 중요성이 날로 증대되고 있다. 지난 십수년간 해양환경 내에 존재하는 EDCs의 위해성에 대한 생물학적 평가가 다양한 생물종들을 대상으로 활발하였다. 특히 내분비계 장애물질 가운데 여성호르몬 (estrogen)과 유사한 특성을 갖는 물질인 비천연에스트로젠 (xenoestrogen)에 의한 어류의 생식교란 현상을 검색하려는 연구가 매우 활발하였다 (reviewed in 계와 한 2000). 지금까지 몇몇 양식 또는 실험어종에서 estrogen에 의해 발현이 유도되는 난황전구단백질 (vitellogenin, VTG), 요막단백질 (choriogenin) 등

* Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel. 02-2290-0958, Fax. 02-2298-9646, E-mail. mcgye@hanyang.ac.kr

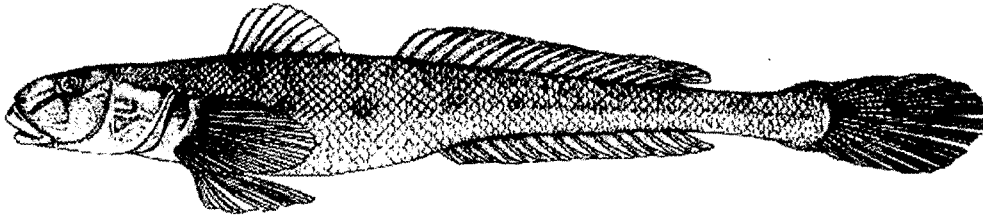


Fig. 1. *Synechogobius hastus*. Adult male of 400 mm total length.

몇몇 생물학적표시유전자 (biomarker gene)들이 동정되었으며, 개체의 기관 (ex. liver tissue) 또는 조직배양 (ex. liver cell culture) 수준에서 이들 biomarker 유전자의 발현을 RNA 및 단백질 수준에서 검출함으로써 새로운 xenoestrogen의 검색 수단을 개발하기 위한 연구 및 내분비계 장애효과를 유발하는 최소한의 농도 등 환경 내 EDCs의 적절한 안전 및 허용기준을 제시하기 위한 연구들이 진행되었다 (Hepell *et al.* 1995; Sumpter and Jobling 1995; Hennies *et al.* 2003; Rotchell and Ostrander 2003; 계와 한 2000). 여러 biomarker 가운데 VTG를 이용한 검사법은 다양한 biomarker 가운데 OECD 표준으로 채택되었다 (OECD 1992). 이들 대부분의 연구는 송어, 넙치 등의 실험 어종을 대상으로 하였지만 최근에는 자국의 수환경 내에 서식하는 야생 어종에 대한 내분비계 장애물질 위해성을 평가하기 위한 연구가 강화되고 있다. 그러나 한국에서 야생의 해산 어류를 대상으로 xenoestrogen 오염추적을 위한 biomarker는 아직까지 개발되어 있지 않고 있다.

망둑어과 어류의 경우 이미 일본과 유럽의 강하구 및 연안역에 서식하는 어종을 대상으로 개체 또는 조직 수준의 다양한 biomarker를 이용하여 xenoestrogen을 포함한 내분비계장애물질의 생태독성을 평가하기 위한 연구가 활발하다 (Falandysz *et al.* 2001; Corsi *et al.* 2003; Kirby *et al.* 2003; Moore *et al.* 2003; Ohkubo *et al.* 2003; Robinson *et al.* 2003). 풀망둑 (*Synechogobius hastus*)은 농어목, 망둑어과의 어류로 한국과 중국의 황해연안 및 일본 규수 지역의 강의 하구에서부터 연안, 조간대에 폭 넓게 분포한다 (Figs. 1, 2). 각종 저서동물, 작은 어류 및 새우 등을 포식하며 초봄에 산란한다 (Akihito *et al.* 1993; Kim 1997). 강하구 및 인접 조간대는 육지로부터의 오염 부하가 커 이 지역에 서식하는 어류를 포함한 다양한 해양생물들에서 특정 오염원 노출에 따른 생체적응 및 방어차원에서 일어나는 다양한 유전자발현은 환경오염을 추적하는 생체지표 (biomarker)로 활용이 가능하다. 특히 풀망둑의 서식지 및 먹이활동 특성상 다양한 오염물질에 의한 노출 및 이에 따른 생체영향이 기대되므

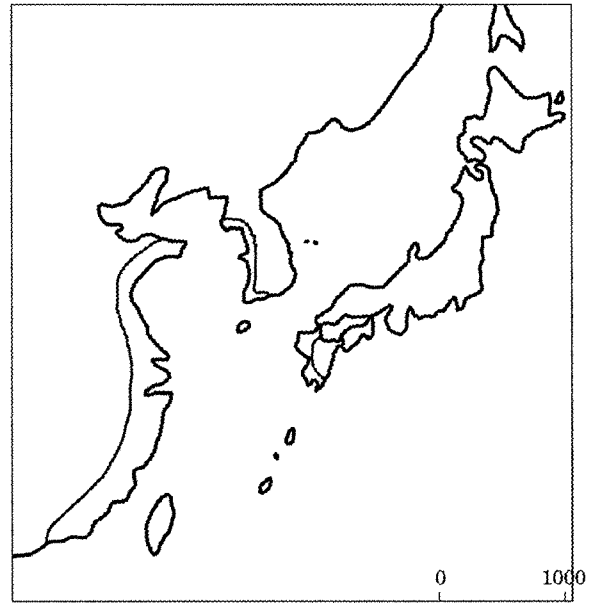


Fig. 2. Distribution of *S. hastus*. Adopted from Kim (1997).

로 이들이 서식하는 지역에서의 환경오염 모니터링을 위한 모델생물로서 유용할 것으로 예상된다. 본 연구는 연안환경 내에서 xenoestrogen 오염을 정밀하게 추적하기 위한 기술 개발의 일환으로 풀망둑의 VTG cDNA 염기서열에 근거한 reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) 시험법을 최적화하였다.

재료 및 방법

1. 채집, 사육 및 전처리

풀망둑 암수 개체는 2003년 1월 경기도 화성군 남양면 화옹호 일대에서 정치망에 포획된 개체를 사용하였다. 채집된 개체들은 실험실로 운반한 후 여과된 해수 탱크에서 $10 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 저온 수조에서 1주간 사육하여 적응시켰다. 채집된 개체는 체장 300~600 mm에 달하였으며 암컷을 기준으로 난소의 발달이 전장 300 mm 이상의 개

체에서 뚜렷하였으며 VTG 발현의 분석에는 전장 400 mm 이상의 개체를 사용하였다.

2. RNA 분리 및 역전사

폴망독의 두부를 타격하여 도살한 후 복강을 해부하여 암컷 및 수컷의 간 조직을 절취하였다. 분리된 간 조직은 20배 부피의 TRIzol 용액 (Life Technologies, USA)에 옮긴 후 4°C에서 전동마쇄기 (Polytron, USA)를 이용하여 균질화하였다. 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리한 후 0.1% DEPC 증류수에 3 mg ml⁻¹ 농도로 용해하였다. 역전사 반응에는 murine leukemia virus [MuLV] reverse transcriptase (Applied Bioscience, USA)을 이용하였고 제조사의 용법에 따라 RNA 3 µg을 이용하여 20 µl 부피의 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

3. PCR의 최적화

역전사 제조한 간조직의 cDNA 1 µg을 i-Taq (Biorad, USA) PCR kit를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응액의 조성은 20 mM Tris, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.25 u i-Taq, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 pM each primer, 1/20 RT

reaction으로 하였다. 사용한 VTG primer는 5'-TCAAG-TTTTTGGAGCTGATCCAG-3' (forward), 5'-CAGCAT-TA CCCATAACTTTAGCCC-3' (reverse)이며 부분적으로 확인된 폴망독의 VTG cDNA 염기서열에 근거하여 제작하였다 (심과 계 2003). 각 시료에 존재하는 cDNA의 상대적인 정량을 위해 beta actin을 증폭하여 비교하였다. Beta actin primer는 5'-ATGGATGATGAAATTGCGCACTTG-3' (forward), 5'-CTGGGTCATCTTCTCCCTGTTGGC-3' (reverse)를 사용하였다 (Lee *et al.* 2000). 최적 annealing 온도를 확인하기 위해 암컷 간을 이용하여 제작한 cDNA를 이용하여 50~70°C의 온도 구배 조건에서 40회 PCR을 수행하였고 VTG는 58°C, beta actin은 55°C에서 최적화되었다 (Fig. 3). 각 PCR 단계는 denaturation: 95°C, 30 sec; annealing: 55 or 58°C 30 sec; extension: 72°C, 30 sec로 하였고 i-Cycler (BioRad, USA)를 이용하였다. 분리된 RNA 속에 오염되어 있는 genomic DNA의 증폭에 의한 PCR 결과의 오해석을 막기 위해 역전사반응을 거치지 않은 RNA 0.1 µg를 대조군으로 사용하였다. 간 cDNA로 부터 VTG 및 beta actin mRNA 발현 정량을 위한 최적의 PCR 반응 회수를 결정하기 위해 VTG의 경우 수컷은 20~40 cycle, 암컷은 10

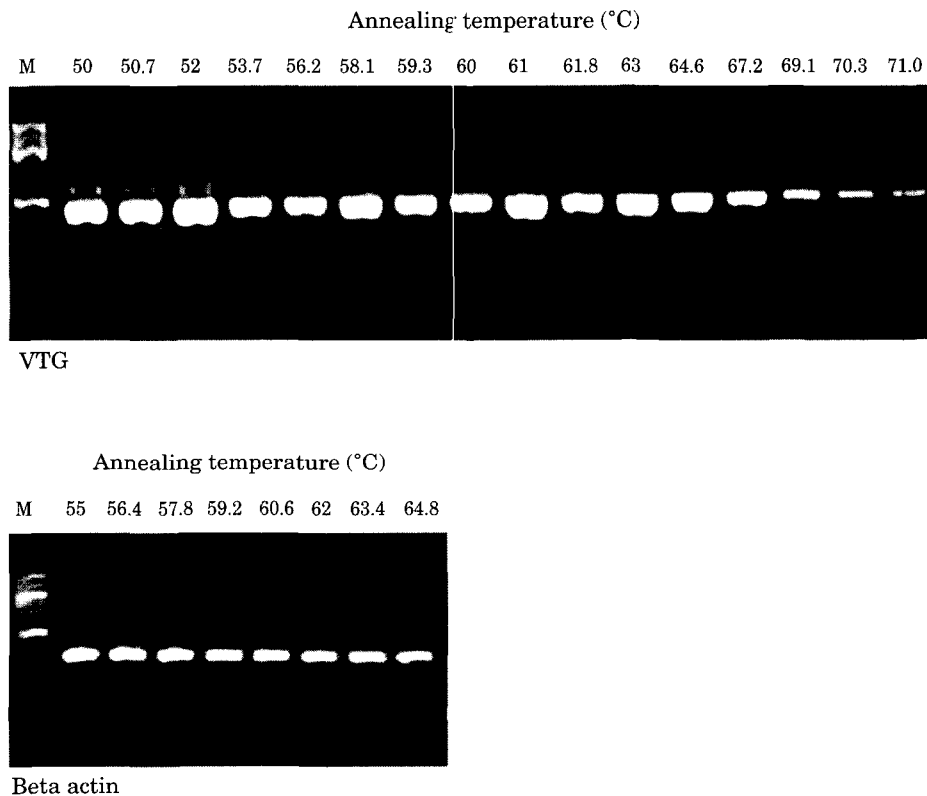


Fig. 3. Optimization of annealing temperature for RT-PCR of vitellogenin and beta actin mRNA in *S. hastus*. (A) VTG (B) beta actin.

~30 cycle에서 PCR을 진행하였고 beta actin은 암수 모두 10~40 cycle의 PCR을 진행하였다. PCR 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr 염색하였다. Gel documentation system (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 밴드의 강도를 측정한 후 PCR 반응 회수-반응량 곡선을 얻었다. 차후 정량적 분석을 위해 PCR cycle 수의 증가에 따라 PCR 반응산물의 증가가 뚜렷한 구간을 설정하였다(Gye and Ohsako 2003).

결과 및 논의

암컷의 간에서 추출한 RNA로 제작한 cDNA로부터 10~30 cycle의 PCR 증폭시 VTG mRNA 반응산물이 일정하게 증가하였다. 반면 수컷의 경우 28~38 cycle의 PCR 증폭 시 반응산물이 일정하게 증가하였고 이후 단계의 PCR에서는 더 이상 증가하지 않았다. 함께 증폭된

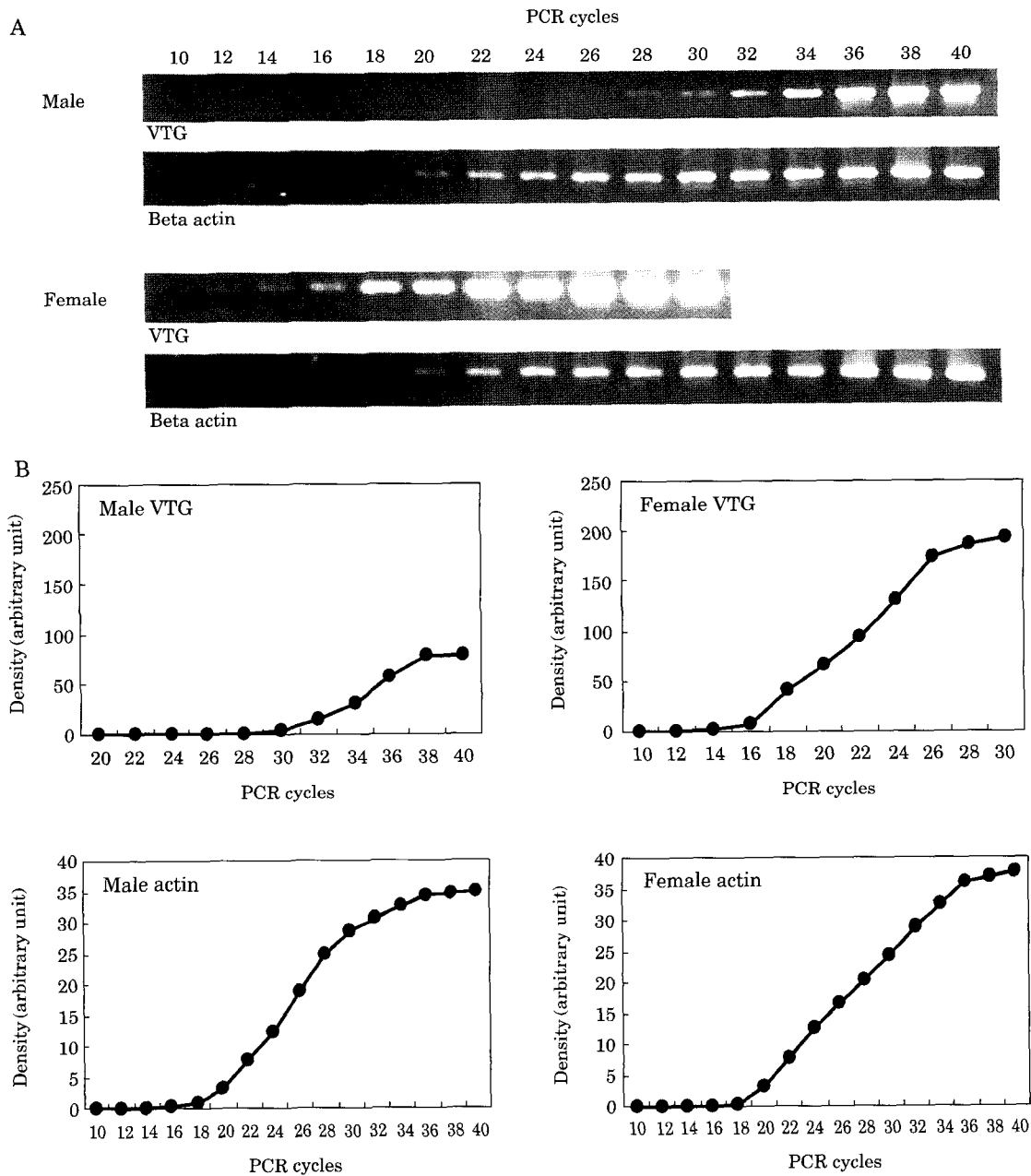


Fig. 4. Optimization of PCR cycle for RT-PCR of vitellogenin and beta actin mRNA in *S. hastus*. (A) RT-PCR of vitellogenin (VTG) and beta actin mRNA in male and female livers. (B) Densitometric analysis of VTG mRNA level and beta actin mRNA. cDNA made from male and female livers was analyzed.

beta actin RNA의 경우 압수 공히 18~30 cycle의 PCR 증폭 시 반응산물이 일정하게 증가하였다(Fig. 4). 차 후 폴망둑 수컷의 간에서 VTG 및 beta actin 2종의 primer set를 이용한 multiplex PCR 방법으로 semiquantitative RT-PCR을 수행할 경우 26 cycle에서 하는 것이 바람직할 것이며 이때 수컷에서 VTG가 확인될 경우 estrogen의 영향을 받은 것으로 생각할 수 있을 것이다.

반응 사이클 수에 따른 VTG RT-PCR 증폭산물의 증가 양상은 암컷에서는 최저 10 cycle에서 확인된 반면 수컷에서는 28 cycle에서 확인된다. 따라서 산술적으로 폴망둑 수컷 간에서 VTG mRNA의 발현량은 암컷의 2^{-18} 에 상당하는 것으로 추산된다. 이와 유사하게 실험어종인 tilapia와 sheephead minnow 수컷의 간에서도 미량($0.04 \sim 0.05 \text{ ng } \mu\text{g}^{-1} \text{ total RNA}$)의 VTG mRNA가 발현된다(Lim *et al.* 1991; Bowman *et al.* 2000). 이처럼 estrogen 또는 xenoestrogen을 특별히 처리하지 않은 수컷에서 VTG가 발현되는 이유는 수컷 체내에 존재하는 estrogen 때문으로 추정된다. 비록 수컷이라도 혈중에는 미량의 estrogen이 존재하며 이들은 남성생식세포의 증식을 촉진하는 등 정상적인 정자형성에 중요한 역할이 있다(Hess *et al.* 1997; Miura *et al.* 1999). 또한 척추동물 수컷의 정소 뿐 아니라 뇌조직에서도 aromatase가 발현된다(Schlinger *et al.* 1992; Nitta *et al.* 1993). 따라서 간 조직에서 estrogen 수용체를 발현할 경우 혈액 내에 존재하는 미량의 estrogen에 의해 VTG 유전자의 전사가 가능할 것으로 추측되며 RT-PCR과 같이 민감한 검출방법을 사용하게 되면 미량의 VTG mRNA의 존재를 확인할 수 있을 것이다. 특히 분석에 사용된 폴망둑은 전량 1월에 채집된 것으로 이시기는 암컷의 난황형성기에 해당한다(계 2002). 어류의 경우 암컷 뿐 아니라 수컷의 경우에도 주 번식기에 혈중 estrogen level이 상승한다(Amer *et al.* 2001). VTG 유전자의 전사는 estrogen에 의해 신속하게 유도되지만 estrogen 자극이 사라졌을 경우 곧바로 전사체가 소멸되는 특징을 갖는다(Hemmer *et al.* 2002). 본 연구에 사용된 수컷 개체는 채집 후 분석까지 2주간의 적응기를 두었으므로 추가적인 외인성 estrogen의 영향이 없거나 미미한 상태에서 분석이 이뤄졌다. 따라서 수컷에서 미량의 VTG mRNA가 발현되었다고 해서 이들이 xenoestrogen에 의해 오염되었다고 단정하기는 어려우며, 오히려 수컷 생체 내에 존재하는 미량의 estrogen에 의해 발현되어 검출되었지만 내분비계장에 효과는 없는 것으로 추정할 수 있다. RT-PCR 등을 이용한 간조직에서의 VTG mRNA의 검출은 ELISA법을 이용한 혈중 VTG 단백질의 검출보다 예민하다. 그러나 VTG mRNA

는 estrogen에 대해 노출된 후 단기간에만 검출되는 반면 단백질은 이보다 더 오랜 기간동안 검출된다(Hemmer *et al.* 2002). 따라서 대상 어류의 서식활동범위 및 전체 서식지에서의 오염도의 지역적 편차 등이 VTG mRNA 발현에 기초한 xenoestrogen 오염여부에 대한 해석에 고려되어야 할 것이다. 장차 본 연구를 통해 확립된 VTG mRNA의 RT-PCR 검출법은 liver cell primary culture 등에 적용하여 잠재적인 estrogen 활성을 갖는 물질의 검색에 이용될 수 있을 것이다. 어류의 VTG 발현을 이용한 estrogen활성의 검출을 위해 *in vitro* 시험법이 개발되어 이용되고 있지만 대사경로를 통해 활성화된 후 estrogenic 활성을 보이는 물질의 검색에는 적합지 않으며, proestrogen은 검출하지 못하며, antiestrogen의 검출감도는 미약하고 전신적으로 나타날 수 있는 생리적 변화에 대한 정보는 제한되며, *in vivo*에서 관찰되는 신호의 증폭이 원활하지 않으므로 estrogen 활성의 검출에 둔감한 특징을 갖는다(Folmar *et al.* 2002). 따라서 *in vitro* VTG 발현에 기초한 특정 물질의 estrogen 활성에 대한 시험법은 xenoestrogen의 영향을 과소평가할 위험이 있으므로 *in vivo* 시험 결과와 반드시 함께 비교되어야 할 것이다. 다양한 외인성 estrogen에 의한 영향을 확인하기 위해서는 추정되는 EDCs 물질 별로 투여 농도-발현량 관계에 근거한 구체적인 기준의 설정에 관한 연구와 함께 다양한 해산 어류들을 대상으로 다양한 biomarker gene의 발굴과 xenoestrogen을 포함한 내분비계장애물질 검색을 위한 표준화 연구가 필요할 것이다.

결 론

폴망둑 vitellogenin (VTG) cDNA의 부분 염기서열에 근거하여 폴망둑 간에서 VTG mRNA의 발현 검출법을 RT-PCR법으로 최적화하였다. 폴망둑 수컷은 암컷의 2^{-18} 에 상당하는 미량의 VTG mRNA를 발현하는 것으로 확인되었다. 폴망둑에서 최적화된 RT-PCR 법을 이용하여 *in vitro*에서 estrogenic활성을 갖는 내분비계장애물질의 검색 및 특정해역과 강하구에서의 xenoestrogen 노출여부의 판정이 가능할 것이다.

사 사

본 연구는 해양수산부 수산특정연구비(Proj. No. 20010060)의 지원에 의해 수행되었음.

참고 문헌

- 제명찬. 2002. 폴망둑 (*Synechogobius hastus*)의 난황형성과 난황전구 단백질. 한국육수학회 춘계학술대회 초록집. 74pp.
- 제명찬, 한명수. 2000. 칙추동물의 난황형성과 환경에스트로젠. 환경생물. 18:291-298.
- 심대용, 제명찬. 2003. 폴망둑 (*Synechogobius hastus*) 난황전구단백질의 RT-PCR 검출법. 환경생물학회 춘계학술대회 초록집 26pp.
- Akihito P, A Iwata, K Sakamoto and Y Ikeba. 1993. Suborder Gobiodei. pp.1079-1082. In: Fishes of Japan with Pictorial Keys to the Species. Ed.: T. Nakabo, Tokyo: Tokai University Press.
- Amer MA, T Miura, C Miura and K Yamauchi. 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). Biol. Reprod. 65:1057-1066.
- Bowman CJ, KJ Kroll, MJ Hemmer, LC Folmar and ND Denslow. 2000. Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 120:300-313.
- Corsi I, M Mariottini, C Sensini, L Lancini and S Focardi. 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. Mar. Pollut. Bull. 46:203-212.
- Falandysz J, L Strandberg, T Puzyn, M Gucia and C Rappe. 2001. Chlorinated cyclodiene pesticide residues in blue mussel, crab, and fish in the Gulf of Gdansk, Baltic Sea. Environ. Sci. Technol. 35:4163-4169.
- Folmar LC, MJ Hemmer, ND Denslow, K Kroll, J Chen, A Cheek, H Richman, H Meredith and EG Grau. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. Aquat. Toxicol. 60: 101-110.
- Gye MC and S Ohsako. 2003. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. Toxicol. Lett. 143:217-222.
- Hemmer MJ, CJ Bowman, BL Hemmer, SD Friedman, D Marcovich, KJ Kroll and ND Denslow. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. Aquat. Toxicol. 58:99-112.
- Hennies M, M Wiesmann, B Allner and H Sauerwein. 2003. Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. Sci. Total Environ. 309:93-103.
- Heppell SA, ND Denslow, LC Folmar and CV Sullivan. 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environ. Health Perspect. Suppl. 7:9-15.
- Hess RA, D Bunick, KH Lee, J Bahr, JA Taylor, KS Korach and DB Lubahn. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature 390:509-512.
- Hong HK, S Takahashi, BY Min and S Tanabe. 2002. Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. Environ. Pollut. 117:475-486.
- Im SH, K Kannan, M Matsuda, JP Giesy and T Wakimoto. 2002. Sources and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments from Masan Bay, Korea. Environ. Toxicol. Chem. 21: 245-252.
- Jeong GH, HJ Kim, YJ Joo, YB Kim and HY So. 2001. Distribution characteristics of PCBs in the sediments of the lower Nakdong River, Korea. Chemosphere 44:1403-1411.
- Kaminuma T, C Ohtake and N Kabuyama. 2000. Distribution and origin of plastic resin pellets as environmental pollutants at the East China Sea area. Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku 118:90-99.
- Kang SG, MS Choi, IS Oh, DA Wright and CH Koh. 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. Sci. Total Environ. 234:127-137.
- Khim JS, KT Lee, K Kannan, DL Villeneuve, JP Giesy and CH Koh. 2001. Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40:141-150.
- Kim IS. 1997. Freshwater Fishes. In: Illustrated Encyclopedia of Fauna and Flora of Korea. Ministry of Education of Republic of Korea. 37:444-446.
- Kirby MF, J Bignell, E Brown, JA Craft, I Davies, RA Dyer, SW Feist, G Jones, P Matthiessen, C Megginson, FE Robertson and C Robinson. 2003. The presence of morphologically intermediate papilla syndrome in United Kingdom populations of sand goby (*Pomatoschistus* spp): endocrine disruption? Environ. Toxicol. Chem. 22:239-251.
- Lee JS, SH Lee and MC Gye. 2000. The beta-actin gene of two species of southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow (*Rhynchocypris oxycephalus*) from the family Cyprinidae. DNA

- Seq. 11:301-307.
- Lee KT, S Tanabe and CH Koh. 2001. Contamination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 42:273-279.
- Lim EH, JL Ding and TJ Lam. 1991. Estradiol-induced vitellogenin gene expression in a teleost fish, *Oreochromis aureus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82:206-214.
- Martin M, Richardson BJ, Lam PK. 2003. Harmonisation of polychlorinated biphenyl (PCB) analyses for ecotoxicological interpretations of southeast Asian environmental media: what's the problem? *Mar. Pollut. Bull.* 46:159-170.
- Miura T, C Miura, T Ohta, MR Nader, T Todo and K Yamauchi. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:230-234.
- Monirith I, D Ueno, S Takahashi, H Nakata, A Sudaryanto, A Subramanian, S Karuppiah, A Ismail, M Muchtar, J Zheng, BJ Richardson, M Prudente, ND Hue, TS Tana, AV Tkalin and S Tanabe. 2003. Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Mar. Pollut. Bull.* 46:281-300.
- Moore MJ, IV Mitrofanov, SS Valentini, VV Volkov, AV Kurbskiy, EN Zhimbey, LB Eglinton and JJ Stegeman. 2003. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. *Mar. Pollut. Bull.* 46:107-119.
- Nitta H, D Bunick, RA Hess, L Janulis, SC Newton, CF Millette, Y Osawa, Y Shizuta, K Toda and JM Bahr. 1993. Germ cells of the mouse testis express p450 aromatase. *Endocrinol.* 132:1396-1401.
- OECD. 1992. Guideline 204: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development. Paris.
- Ohkubo N, K Mochida, S Adachi, A Hara, K Hotta, Y Nakamura and T Mataubara. 2003. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for two form of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131:353-364.
- Robinson CD, E Brown, JA Craft, IM Davies, CF Moffat, D Pirie, F Robertson, RM Stagg and S Struthers. 2003. Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquat. Toxicol.* 62:119-134.
- Rotchell JM and GK Ostrander. 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 6:453-496.
- Schlinger BA and AP Arnold. 1992. Circulating estrogen in a male songbird originate in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7650-7653.
- Shim WJ, JR Oh, SH Kahng, JH Shim and SH Lee. 1998. Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:41-47.
- Sumpter JP and S Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7:173-178.

Manuscript Received: December 30, 2003

Revision Accepted: February 11, 2004

Responsible Editorial Member: Wonchoel Lee
(Hanyang Univ.)